

人二倍体細胞の継代培養における増殖様式の変化

著者	早川 勝
号	656
発行年	1970
URL	http://hdl.handle.net/10097/18761

氏 名（本籍） はや かわ きさる
早 川 勝

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 6 5 6 号

学位授与年月日 昭 和 4 5 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研究科専門課程 東北大学大学院医学研究科
（博士課程）外科学系専攻

学位論文題目 Progressive changes of the growth
characteristics of the human diploid
cells in serial cultivation in vitro
（人二倍体細胞の継代培養における増殖様式
の変化）

（主 査）

論文審査委員 教授 榎 哲 夫 教授 山 根 績

教授 佐 藤 春 郎

論 文 内 容 要 旨

研 究 目 的

培養細胞は、in vitro の培養系での増殖様式により、2つに分類できる。1つは無限に増殖可能な細胞集団で、established cell line (樹立細胞系)と呼ばれ、他は、ある程度の分裂の後、分裂不能になってしまう cell strain (細胞株)と呼ばれる集団である。前者は、多くは可移植性の細胞であり、生体に移植した場合、悪性腫瘍をつくる。その染色体は、二倍体性を逸脱しているのが普通である。正常組織を、in vitro の培養に移すと、その二倍体性を維持する限り、それは限られた増殖しか示さない。この二倍体細胞死滅の原因は、細菌の感染や、潜在性ウイルスの顕在化によるものではなく細胞そのものに内在する性質であり、その分離された動物種により、概ね分裂回数が決まっているという。人二倍体細胞は、非常に樹立細胞系に移行しにくいと云われ、細胞の老化を観察するのに適した系である。

本実験では、この細胞を用いて、継代をおつて、様々なうえこみ数のもとでの増殖様式を明らかにし、二倍体細胞集団死滅への経過を詳細に観察した。

実験材料および方法

細胞は、人工流産した胎児の肺より分離した。ほとんど繊維芽細胞のみの二倍体細胞集団で、組織からの分離は、4°C、24時間、酵素液に浸した組織細片に、新たに酵素液を加えて、マグネチック スターラーで数時間攪拌し、細胞を離散させ、遠心で細胞を集め、初代培養に移した。

培地は、EagleのMEMに、親牛血清20%、bactopeptone 0.05%、kanamycin 0.01%を加えたものを用い、酵素液は、Dulbeccoの磷酸緩衝液1リットル当り、500mgの trypsin, 50mgのEDTA, 100mgのkanamycinを溶解したものを使用した。

細胞の維持および継代には、5%の炭酸ガス孵卵器にて、90mmのシャーレを用い、培地交換は3~4日目に行なった。うえかえは、full sheetに達する直前、酵素で細胞のsheetをばらばらにした後、培地を加え、pipettingで細胞を離散させ、約100万個を継代した。増殖曲線を得るためには、3000個~3万個のうえこみは、45mmシャーレに行ない、100個~1000個に於ては、35mmのFalcon製プラスチックシャーレを使用した。

細胞数計算は、細胞数の十分多い時には、細胞懸濁液を血球計算盤を用いて数え、少数細胞の増殖を見るためには、シャーレに附着した細胞を直接固定、染色し、実体顕微鏡にて数えた。

実験成績および考 按

大量培養に於いて、継代による増殖様式の変化を見るため、各継代の細胞より3万個の細胞を

45mm シャーレにうえ、増殖曲線をとると、初代より30代までは、その増殖速度はほとんど変わらず、細胞倍化時間は 30 ± 3 時間であつた。30代を過ぎると、倍化時間は急速に延長し、40代ではほとんど増殖不能になつてしまふ。すなわち、大量培養での継代の効果は、ChangやHayflichの形態的観察の結果と同様、培養末期に急速に現われる。継代によつてシャーレにつきえぬ細胞が増加してゆき、それが倍化時間の延長をもたらすとの報告があるが、本実験では認められなかつた。

100個の細胞をまいて、コロニー形成率で継代による変化をみると、10代までは約50%で初期と変わらず、10代を過ぎると急速に低下し、20代では、大量培養で初期と変わらず増殖しているにかかわらず、ほとんどコロニーは形成されない。すなわち、継代を経るにしたがい、少数細胞では増殖しにくくなつてゆくことが予想される。

これらのことから、細胞数依存的性格と継代との関係を調べてみた。各継代において、100個から3万個まで、うえこみ数を変えて、それぞれ増殖曲線を描いてみると、継代2代目では、100個でも3万個でも、倍化時間30時間で変わらず、8代目では、1000個では増殖抑制はないが、100個では増殖は遅く、22代では、1000個でも増殖が遅くなつてゐる。これは、継代がすすむにつれて、より細胞数依存性になつてゆくことを示すものであり、このことが、ついに大量培養でも増殖不能にしてしまふと思われる。

細胞数依存性に関して、Eagleらは、細胞膜の漏出性と関係づけ、細胞数が少ないと、細胞内から培地に漏出する中間代謝産物が細胞当たり多くなり、細胞の代謝がうまく回転しないことによると説明している。それ故、継代初期および末期の細胞のfeeder actionの強さをはかり、その漏出度を比較してみた。6代目及び22代目の細胞によつてconditionされた培地中での、22代目の細胞100個の増殖により、feeder actionを検討しながら、それは6代目の細胞の方が強く、継代が進むにつれて、細胞膜が、心ずしもより漏出性になるのではないことがわかつた。人二倍体細胞の細胞数依存的性格は、Eagleらの説とは別の機序によるものだろうと思われる。

二倍体細胞死滅の原因が、培地や酵素の影響、pHの変化、放射線等と無関係とは思えないが、DNA合成機構そのものには障害のないこと、SV₄₀による形質転換の実験から、末期の細胞程、DNA合成の制御が強くなつてゐることから、本質的には、分化と同じ機構によるものと思われる。

結 語

人二倍体細胞の増殖様式の観察から、継代による変化は、細胞数依存的性格の増強であり、それは、細胞膜の漏出性の増強によるものではないことを示した。

審 査 結 果 の 要 旨

二倍体細胞集団が、*in vitro* の培養系で一定の分裂の後に死滅してしまうことに着目し、細胞の老化について研究した Hayflick の報告以後、二倍体細胞の死滅は、細菌やウイルスの感染によるものでなく、二倍体細胞の性質であると認められるに至った。しかし、老化現象は生物界に普遍的に観察される現象でありながら、その科学的見地からの追究は、組織培養が比較的容易に行なわれるようになった現在でも、そう多くはないようである。本実験では、比較的長期にわたり安定な増殖を示し、樹立細胞系に移行することの稀なヒト二倍体細胞を用いて、その継代による変化を増殖様式の観点から詳細に観察している。

その結果、継代の効果は Hayflick や Chang の形態的観察からの報告とは異なり、培養初期より、細胞数依存性の性格の増強というかたちで現われてくることを明らかにした。また、細胞数依存性の機序に関しては、Eagle らの説明とは合致せず、細胞膜の漏出性の増大によるものではなく、このことはウイルス感染時における DNA 合成、培養初期および末期のウイルスによる形質転換の頻度の差などと考え合せると、老化が二倍体細胞内の合成の制御機構の強まりによるものであることを示唆する。最近、発癌剤等による試験管内発癌に関する実験も多くなされているが、*in vitro* では癌化を二倍体性からの逸脱としてとらえており、正常細胞の *in vitro* における増殖様式をみることは、発癌実験に対しても重要な関係を持つと考えられる。

以上の如く、継代による増殖様式の変化が細胞数依存性の増強であるということは新しい知見であり、また、これらの結果は化学発癌剤やウイルスによる細胞の形質転換の実験の基礎となるものであつて、細胞生物学に寄与するところが少なくない。よつて、学位授与に値するものと認める。